

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年10 月13 日 (13.10.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/094563 A1

- (51) 国際特許分類: A01H 13/00 (74) 代理人: 阿形 明, 外(AGATA, Akira et al.); 〒1050004 東京都港区新橋二丁目 1 2 番 5 号池伝ビル 3 階 阿形特許事務所 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/006167
- (22) 国際出願日: 2005 年3 月30 日 (30.03.2005) (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2004-108563 2004 年3 月31 日 (31.03.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関一丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 垣田 浩孝 (KAKITA, Hirotaka) [JP/JP]; 〒7610395 香川県高松市林町 2 2 1 7 番 1 4 独立行政法人産業技術総合研究所四国センター内 Kagawa (JP). 上嶋 洋 (KAMISHIMA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒7610395 香川県高松市林町 2 2 1 7 番 1 4 独立行政法人産業技術総合研究所四国センター内 Kagawa (JP).
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: IMMATURE UNIALGAL CULTURE STRAIN

(54) 発明の名称: 非成熟性単藻培養株

(57) Abstract: It is intended to provide a novel unialgal culture strain showing a high culture efficiency of a large-sized red alga which is immature, can be stored over a long period of time, can be cultured and has at least one of the following properties, i.e., producing a physiologically active substance at a high yield, showing a high growth speed of the alga body, and being highly capable of absorbing nutritional salts. Namely, an immature unialgal culture strain originating in a large-sized red marine alga which is characterized by showing no matured male gametophyte in nature but showing matured tetrasporophyte alone and grows in a natural marine water area containing fresh water. This unialgal culture strain is constructed by collecting the matured sporophyte, cutting it and allowing to stand to thereby release spores, culturing the spores and continuously proliferating and culturing after the growth of an upright body from a spore.

(57) 要約: 紅藻類大型藻類について、非成熟性で長期間にわたり保存可能、培養可能で、生理活性物質の生産量が高い、藻体の生長速度が早い及び栄養塩の吸収能力が高いという性質のうち、少なくとも1つの性質を有している培養効率が高い新規な単藻培養株を提供する。天然で成熟体として雌性配偶体が検出されず、四分孢子体のみの成熟体が検出される特徴をもち、淡水混入天然海水域で繁殖する紅藻類大型海藻由来の非成熟性単藻培養株であって、この成熟孢子体を採取し、この孢子体を切断して静置することにより孢子を放出させ、放出された孢子を培養し、発芽した孢子から直立体が生育した後も増殖培養することにより該単藻培養株を製造する。

WO 2005/094563 A1

明 細 書

非成熟性単藻培養株

技術分野

- [0001] 本発明は、長期間にわたって保存あるいは培養を継続しても成熟せず、他の藻類が極めて付着しにくい紅藻類大型海藻由来の新規な単藻培養株、その製造方法及びそれが増殖した藻体に関する。

背景技術

- [0002] 森林伐採などで陸上生物資源の枯渇が危ぶまれている現在、有用海洋資源を探索し、その利用をはかることは、資源小国日本における重要な課題となっている。特に、海洋という特殊な環境で生育する大型海藻には陸上生物にみられない特殊成分が含まれていることがあり、これらの特殊成分が食品や工業製品の原料として利用されているが（徳田廣、大野正夫、小河久朗著、「海藻資源養殖学」、緑書房、1987年、p. 35－66；及び「食品開発」、1984年、第19巻、p. 43－48）、近年に至り、大型海藻の分割画分やそれから分離された成分の中から、いくつかの新規生理活性物質が見出され、その結果、大型海藻がファインケミカルの原料として注目されるようになってきている（「月刊海洋」、1995年、第27巻、p. 13－21及び「月刊海洋」、1995年、第27巻、p. 34－39）。
- [0003] 大型海藻に含有される成分は、海藻生育時期によって質的変動や量的変動が起こるため（「ハイドロバイオロギア（Hydrobiologia）」、1993年、第260／261巻、p. 541－547）、有用成分生産の目的には生育時期を精密制御した培養方法、例えば環境因子を精密制御した室内培養などが必要になってくるが、海藻の生長速度が遅いことやろ過海水の大量消費などが障害となり、大型海藻の大量室内培養は非常に困難である。
- [0004] すなわち、藻類の室内培養には、その条件設定が重要であり、この条件設定のための生長実験用の海藻試料が必要であるが、大型海藻生長評価実験において、天然に生育している大型海藻をそのまま使用することはむずかしい。
- [0005] その理由は、大型海藻に付着する共存微生物などの生長速度が人工的培養条件

下で大型海藻よりも速い場合が多く、微生物などが異常増殖して大型海藻の生長に影響を及ぼすからである。そして、このような付着共存微生物を除去するには薬剤処理法や単藻培養株作成法が知られているが、薬剤処理法よりも藻体のダメージが少ない理由で後者の方法が好ましい。

- [0006] 藻類の有用成分の開発に際しては、藻類は一般に成熟後枯死するので、毎年単藻培養株を入手しなければならないが、成熟しない培養株があれば、長時間連続してその培養を継続しても成熟、枯死することがないので、毎年新鮮な培養株を入手しなくてもよくなる。大型海藻のうち、緑藻類については、例えばアオサ属に属する難成熟性海藻株が知られているが、紅藻類については、これまでこの種の海藻株は全く知られていない。
- [0007] 他方、一般に単藻培養株を増殖させる前段階では、直立体を生長の遅い条件に静置して保存し、この直立体から単藻培養株を増殖培養する方法が知られているが、この直立体から必要量の単藻培養株を増殖させるには、通常かなりの時間、オゴノリ属の海藻の場合2～4週間を要するため、その間実験が停滞するのを免れない。
- [0008] 単藻培養株での増殖と、直立体からの単藻培養株の増殖を並行的に行って処理時間の節約をはかることも考えられるが、この場合、操作が複雑になる上に、培養設備や労力が増大するという欠点がある。
- したがって、この技術分野においては、必要時にすぐに増殖培養でき、あるいは成熟せずに継続的に培養を続けられる単藻培養株の出現が強く要望されていた。
- [0009] 静止期にあるリンパ球を成長させ、増殖する引き金となるマイトジェン刺激を起し、エイズを含む種々の疾病の患者の免疫能を判定したり、新しいガンの治療法であるLAK療法におけるリンパ球の分裂促進を行う赤血球凝集剤の生産量が高いために、紅藻類は特に注目されている。
- [0010] 海藻類を人工的に培養する方法として、緑藻類に属する不稔性海藻例えばアオサを培養して汚染海域の浄化を行う方法(JP2000-254685A)、食品や医薬品原料としてアオサを海洋上又はソーラードーム内で培養する方法(JP11-289894A及びJP2004-97003A)などが提案されている。
- [0011] しかしながら、緑藻類アオサ属海藻は、フラットな形状、膜状をしており、以下の(1)

から(4)の欠点がある。

(1)膜状なので、多層重ねて培養できない。(2)円筒形の紅藻類オゴノリに比較して藻体が弱く、ちぎれやすい。(3)藻体がちぎれやすいため、担体に固定して培養できない。回収が容易でなく、ちぎれ藻が汚染の原因になる。(4)30cm四方を超えるとアオサの曲がりや攪拌による分散が困難になり太陽光の受光損失を生じ、生長速度の低下を引き起こすため、回収し、裁断しなければ、生長速度の回復ができない(JP 2000-254685A及びJP2004-97003A)。

[0012] 一般的に緑藻類は紅藻類海藻よりも生長に強い光強度が必要である。海藻の生長に伴う生産物の利用や生長する海藻の機能を利用するには、緑藻類海藻を使用する場合は、紅藻類海藻を使用する場合よりも一般に強い光強度を保つ設備あるいは条件が必要となる。

[0013] 不稔性アオサは腐って、分解され消失し、一部が残って、次の年、栄養塩濃度が高くなると増殖、異常繁殖する。毎年この繰り返しが起こっていると考えられる。実際に海浜にたまった不稔性アオサが環境汚染の原因となっている。水分を含むアオサは比較的腐りやすく、例えば一日で腐敗するため、培地あるいは海水から回収後は、早急に脱水、乾燥することが必要であることが指摘されている(JP2000-254685A及びJP2004-97003A)。

[0014] これに対し、紅藻類例えばオゴノリは、藻体が丈夫で、切断されにくいいため担体に固定して大量に培養することができ、管理、回収が容易であり、藻類寸法が大きくなっても受光損失は起こりにくく、弱い光でも生長する上に腐敗しにくく、環境汚染を生じないし、藻体が糸状で藻体が重なっていても培養し得るので、大量室内培養に適している。

発明の開示

[0015] 本発明は、このような事情のもとで、紅藻類大型藻類について、非成熟性で長期間にわたり保存可能、かつ培養可能であり、しかも生理活性物質の生産量が高いという性質、藻体の生長速度が大きいという性質、及び栄養塩の吸収能力が高いという性質のうち、少なくとも1つの性質を有している培養効率が高い新規な単藻培養株を提供することを目的としてなされたものである。

- [0016] 本発明者らは、紅藻類大型海藻からの単藻培養株について種々研究を重ねた結果、天然で成熟体として雌性配偶体が検出されず、四分孢子体のみの成熟体が検出される特徴をもち、淡水混入天然海水域で繁殖している紅藻類大型海藻由来の単藻培養株は長期間にわたって成熟せず、しかも長期間にわたって継続培養した後も、他の藻類が極めて付着しにくいことを見出し、この知見に基づいて本発明をなすに至った。
- [0017] すなわち、本発明は、天然で成熟体として雌性配偶体が検出されず、四分孢子体のみの成熟体が検出される特徴をもち、淡水混入天然海水域で繁殖する紅藻類大型海藻由来の非成熟性単藻培養株、天然で成熟体として雌性配偶体が検出されず、四分孢子体のみの成熟体が検出される特徴をもち、淡水混入天然海水域で繁殖している紅藻類大型海藻の成熟孢子体を採取し、この孢子体を切断して海水中に静置することにより孢子を放出させ、放出された孢子を培養し、発芽した孢子から直立体が生育した後も増殖培養することを特徴とする非成熟性単藻培養株の製造方法及び上記の非成熟性単藻培養株が増殖した藻体を提供するものである。
- [0018] 上記した非成熟性単藻培養株とは、通常の培養条件下で3年以上継続して培養しても成熟せず、海藻の単藻培養株作成直後の培養株と同様の生理活性物質を生産するものを意味する。また、低栄養あるいは低温あるいは低光強度など非増殖培養条件で3年以上単藻培養株を保存した後に、通常の培養条件にもたらした場合、培養条件下で3年以上継続して培養しても成熟せず、海藻の単藻培養株作成直後の培養株と同様の性質、すなわち生理活性物質の生産量が高いという性質、藻体の生長速度が大きいという性質、栄養塩の吸収能力が高いという性質のうちの少なくとも1つを有している海藻株を意味する。
- [0019] 次に、本発明を詳細に説明する。
- 本発明の非成熟性単藻培養株は、淡水混入天然海水域、特に塩分1.0質量%以下の海水域、例えば河川の水が海洋に流れ込む河口域において繁殖している、天然で成熟体として雌性配偶体が検出されず、四分孢子体のみの成熟体が検出される特徴を有する紅藻類大型海藻を原料として生産することができる。
- [0020] 本発明において紅藻類大型海藻とは、植物分類系の紅藻綱に属する海藻で大型

のものを指し、主要含有色素としてクロロフィルaとフィコビルリンをもち、光合成によりフロリドシドと紅藻デンプンを生成し、貯蔵するという特徴を有している。この中にはテングサ類、オゴノリ類、スギノリ類、ツノマタ類、アマノリ類などが含まれるが、本発明で用いる紅藻類大型海藻としては、オゴノリ (*Gracilaria verrucosa*)、ツルシラモ (*Gracilaria chorda*) 及びそれらの亜種が好ましい。

[0021] 本発明においてオゴノリ属紅藻類 (*Gracilaria* sp.) とは、(1) オゴノリ属海藻 (*Gracilaria* sp.) に分類される海藻、(2) *Gracilariopsis* sp. に分類される海藻あるいは (3) *Gracilariopsis* sp. に過去に分類された海藻を含む。

[0022] 例えば、日本産海藻では、オゴノリ属紅藻類 (*Gracilaria* sp.) とは、「新日本海藻誌 日本産海藻類総覧、吉田忠生著、内田老鶴圃発行、1998年」においてオゴノリ目 (*Gracilariales*: グラシラリアレス) オゴノリ科 (*Gracilariaceae*: グラシラリアシー) に分類されている海藻を含む。これらの紅藻類は、寒海にも存在するが、特に暖海に多く、日本国ではほとんどすべての海岸地帯に分布しており、寒天の増量物や刺身のつまなどに用いられている。

[0023] 紅藻類大型海藻から、非成熟性単藻培養株を取得するには以下の方法が行われる。すなわち、天然で成熟体として雌性配偶体が検出されず、四分孢子体のみの成熟体が検出される特徴をもち、淡水混入天然海水域で繁殖している紅藻類大型海藻の成熟孢子体の成熟部分を2～5cm、好ましくは3～4cmの長さに切断し、滅菌した水又は海水で洗浄後、滅菌海水中に6～15時間静置し、孢子を放出させる。

[0024] 次に、この放出された孢子を捕集分離し、培養液の入った容器に移植し、温度10～30℃において露光下及び暗所で10～15時間ずつ交互に静置培養する。この際の培養液としては、例えば滅菌した海水に普通の海水強化栄養剤を添加したものが用いられる。

このようにして、15～25日間静置培養後、孢子が発芽して生長した海藻直立体の中から、太く、色が濃い直立体を選び、50～80日間、引き続き静置培養すると、長さ10mmに生長する。

直立体を培養容器の底からピンセットではずしフラスコに移植し、保存培養条件下で培養することにより、藻体が増殖し、その結果一定量以上の単藻培養株を得ること

ができる。

[0025] この培養条件としては、例えば、温度が15～30℃、光強度が50～120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sec}$ 、24時間中8時間以上を明期とした光周期が挙げられる。この間、必要であれば、振とう(50～200rpm程度)やエアレーションを行ってもよい。培養液としては、天然海水でもよいし、人工海水でもよい。場合によっては培養液に、Provasoli(プロバゾリ)の海水補強栄養剤[西澤一俊、千原光雄編集、藻類研究法、共立出版、東京(1979)、pp. 281－305]など海藻生長促進成分を添加してもよい。

[0026] 本発明において単藻培養株とは、直立体が増殖培養により増殖した藻体を意味する。

直立体あるいは単藻培養株は、低栄養、低温、低光強度などの非増殖培養条件下に置くことによって、藻体生長速度を抑えることができ、保存や低増殖培養を行うことができるので、直立体あるいは単藻培養株の使用予定のない場合あるいは、藻体増殖量の調節をしたい場合には、このような培養条件を用いるのが便利である。

[0027] 上記の低栄養、低温、低光強度などの非増殖培養条件は、例えば(1)硝酸態窒素とアンモニア態窒素の合計の濃度が3 μM 以下、リン酸イオン濃度が1 μM 以下などの栄養塩濃度条件、(2)温度が5～14℃の低温条件、(3)光強度が20～40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sec}$ の低光強度条件、及び(4)(1)～(3)の組合せなどによりもたらされる。

[0028] 本発明の非成熟性単藻培養株は、培養条件下で3年以上継続して培養しても成熟せず、付着藻類も増殖しにくい。一般に海藻は、付着藻類が多くなると、海藻よりも生長の早い付着藻類に培地中の栄養分が摂取され、増殖が阻害され、最悪の場合には、枯死するが、本発明の非成熟性単藻培養株は、付着藻類が付着しにくいため、3年以上の長期にわたって保存可能である。また、本発明の非成熟性単藻培養株は、培地による速成培養が可能であり、保存後、所望の時期に迅速に増殖を開始させることができる。

発明を実施するための最良の形態

[0029] 次に、実施例により本発明を実施するための最良の形態を説明するが、本発明はこれらによって何ら限定されるものではない。

[0030] 実施例1

オゴノリ属紅藻類の選抜

オゴノリ属紅藻類(*Gracilaria* sp.)の例として、オゴノリ属紅藻類に属するツルシラモ(*Gracilaria chorda*)について3箇所の地点で1998年4月から2001年3月までの3年間にわたって、海藻の出現量(生長)と成熟の調査を毎月1回行った。

[0031] 調査地点Aとして日本国徳島県徳島市勝浦川河口の勝浦川の中を選んだ。調査地点Aで生育している海藻を以下勝浦川産オゴノリ属海藻(勝浦川産ツルシラモ)という。この場所では、大潮の干潮時には勝浦川産オゴノリ属海藻(ツルシラモ)群落の全体あるいは一部が干潟に現れた。

[0032] 調査地点Bとして徳島県徳島市川内町の海岸(一級河川である吉野川の河口に隣接した海岸)を選んだ。この調査地点Bで生育している海藻(汽水域への適応性は勝浦川産オゴノリ属より低い)を以下徳島県徳島市川内町沖産オゴノリ属海藻[あるいはツルシラモ(吉野川河口域産)]という。

調査地点Cとして徳島県小松島市和田島沖の瀬戸内海を選んだ。この調査地点Cで生育している海藻を以下小松島沖産ツルシラモという。

[0033] 各調査地点で潮間帯の平磯上(調査地点Aについては、干潮時に干上がる河口域)に生息するツルシラモ群落中の単位体積当りのツルシラモ藻類湿質量の変化と、ツルシラモ全個体中の成熟個体数を調べた。この際、縦横20cmの方形枠をツルシラモ群落中に毎回4箇所設置し、4個の方形枠内の成熟個体数の平均値を求めた。

[0034] 採取したツルシラモ藻体の成熟及び非成熟の判定は、実体顕微鏡を用いて観察し、藻体に四分孢子嚢あるいは嚢果が形成されているか否かで判断した。観察により四分孢子嚢の形成が検出された藻体を成熟四分孢子体、一方、嚢果を形成していることが観察された藻体を成熟雌性配偶体と判断した。この観察結果より、全ツルシラモ個体数に対する成熟四分孢子体個体数を成熟四分孢子体の割合(%)として求めた。また、全ツルシラモ個体数に対する成熟雌性配偶体個体数を成熟雌性配偶体の割合(%)として求めた。各調査地点の結果を比較することにより、天然で成熟体として雌性配偶体が検出されず、四分孢子体のみの成熟体が検出される特徴をもつオゴノリ属紅藻類が選抜できる。

[0035] 1998年4月～1999年3月までのツルシラモ成熟個体の調査結果を表1に、1999年4月～2000年3月までのツルシラモ成熟個体の調査結果を表2に、2000年4月～2001年3月までのツルシラモ成熟個体の調査結果を表3にそれぞれ示した。各表の数値はツルシラモ群落中へ設置した4箇所の縦横20cmの方形枠内での値の平均値である。

[表1]

		1998 年										1999 年		
		4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	
調査地点 A	成熟四分胞子体の割合 (%)	0	8	75	15	0	0	0	0	0	0	0	0	
	成熟雌性配偶体の割合 (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
調査地点 B	成熟四分胞子体の割合 (%)	0	16	40	12	0	0	0	0	0	0	0	0	
	成熟雌性配偶体の割合 (%)	0	0	8	20	10	0	0	0	0	0	0	0	
調査地点 C	成熟四分胞子体の割合 (%)	0	10	48	16	0	0	0	0	0	0	0	0	
	成熟雌性配偶体の割合 (%)	0	0	15	24	8	0	0	0	0	0	0	0	

[表2]

		1999 年									2000 年		
		4 月	5 月	6 月	7 月	8 月	9 月	10 月	11 月	12 月	1 月	2 月	3 月
調査 地点 A	成熟四分 孢子体の 割合 (%)	0	8	60	10	0	0	0	0	0	0	0	0
	成熟雌性 配偶体の 割合 (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
調査 地点 B	成熟四分 孢子体の 割合 (%)	0	12	35	15	0	0	0	0	0	0	0	0
	成熟雌性 配偶体の 割合 (%)	0	0	10	24	13	0	0	0	0	0	0	0
調査 地点 C	成熟四分 孢子体の 割合 (%)	0	8	44	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	成熟雌性 配偶体の 割合 (%)	0	0	18	28	14	0	0	0	0	0	0	0

[表3]

		2000 年										2001 年		
		4 月	5 月	6 月	7 月	8 月	9 月	10 月	11 月	12 月	1 月	2 月	3 月	
調査 地点 A	成熟四分 孢子体の 割合 (%)	0	6	78	21	0	0	0	0	0	0	0	0	
	成熟雌性 配偶体の 割合 (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
調査 地点 B	成熟四分 孢子体の 割合 (%)	0	18	43	10	0	0	0	0	0	0	0	0	
	成熟雌性 配偶体の 割合 (%)	0	0	12	25	16	0	0	0	0	0	0	0	
調査 地点 C	成熟四分 孢子体の 割合 (%)	0	6	48	10	0	0	0	0	0	0	0	0	
	成熟雌性 配偶体の 割合 (%)	0	0	10	28	5	0	0	0	0	0	0	0	

[0036] 表1ないし3より、天然で成熟体として雌性配偶体が検出されず、四分孢子体のみの成熟体が検出される特徴を持つオゴノリ属紅藻類として、調査地点Aに繁殖している「勝浦川産オゴノリ属海藻(勝浦川産ツルシラモ)」を選抜することができる。

[0037] 実施例2

(1) 単藻培養株調製用の孢子採取及び孢子植え付け

原料の、天然で成熟体として雌性配偶体が検出されず、四分孢子体のみの成熟体が検出される特徴をもつオゴノリ属紅藻類として、調査地点Aすなわち徳島県徳島市勝浦川河口汽水域(塩濃度0.5質量%)で採取したオゴノリ属大型海藻ツルシラモ(*Gracilaria chorda*)の成熟孢子体を用いた。

[0038] 成熟孢子体の成熟部分を30mmの長さに切断し、滅菌海水で洗浄後、滅菌海水中に一晩静置することにより孢子を放出させた。放出された孢子を滅菌したパスツールピペットを用いて保存培養用培養液30mlの入ったスクリー管に移し、14時間明期、10時間暗期の周期で光を与えて静置培養を行った。1つのスクリー管に植え付ける孢子数は20個ずつとした。スクリー管は全部で1000個使用した。静置培養は、(i) 光強度 $60 \mu \text{mol}/\text{m}^2 \text{sec}$ の一定条件で温度6水準(10°C から 30°C まで 4°C きざみ)、(ii) 温度 18°C の条件で光強度5水準($20 \mu \text{mol}/\text{m}^2 \text{sec}$ から $100 \mu \text{mol}/\text{m}^2 \text{sec}$ まで $20 \mu \text{mol}/\text{m}^2 \text{sec}$ きざみ)の合計11の条件で行った。

[0039] この海水培地は、香川県高松市屋島湾水深約1.5mで採取した海水を $0.20 \mu \text{m}$ のセルロースアセテートメンブランフィルター(アドバンテック東洋社製)でろ過後、1/10容量の蒸留水を添加し混合した後で、 100°C 30分間滅菌し、あらかじめ滅菌処理したProvasoli(プロバゾリ)の海水補強栄養剤を添加することによって調製された。

[0040] (2) 直立体選別;

21日間静置培養した時点で、孢子の発芽が観察された実験群の中から、得られた直立体が太く、赤色色素が鮮やかで、培養液中の浮遊物がない実験条件を選んだ。実施例2では、「温度 18°C 、光強度 $40 \mu \text{mol}/\text{m}^2 \text{sec}$ 」の条件で発芽した直立体を実験材料に選んだ。

[0041] 選ばれた直立体は、静置培養により直立体の長さが10mmになるまで培養を続け

た。この際、培地交換は4週間に1度の頻度で行った。このようにして約70日間で10 mmの長さの直立体を得た。

[0042] (3) 直立体の増殖培養

約10mmに生長した直立体をスクリー管底からピンセットではずしフラスコに移植し、直立体の増殖培養を行った。直立体の増殖培養は、培養液1リットルの入った1リットル丸底フラスコ中で温度16℃、光強度 $40 \mu \text{mol}/\text{m}^2 \text{sec}$ (14時間明期、10時間暗期の光周期)の条件でエアレーションをしながら行った。培養液交換は2週間に1度の割合で行った。増殖培養を70日間行い、直立体を増殖させた。この工程は、直立体の保存にも適応できるので、直立体の保存培養工程ということもある。1個の丸底フラスコ内で増殖した直立体をそれぞれ培養液1リットルの入った数個の1リットル丸底フラスコ中へ移して分割することにより、保存培養工程期間を延長することができる。

[0043] (4) 単藻培養株の予備培養

前工程で増殖させた直立体を、培養液1リットルの入った1リットル丸底フラスコ中で温度18℃、光強度 $40 \mu \text{mol}/\text{m}^2 \text{sec}$ (14時間明期、10時間暗期の光周期)の条件でエアレーションをしながら行った。培養液交換は2週間に1度の割合で行った。このようにして予備培養を35日間行い、単藻培養株を得た。

[0044] (5) 単藻培養株の成熟性評価と生長速度評価

温度制御(温度分布 $\pm 0.5^\circ\text{C}$)、光強度制御(無断階調光)及び日長時間制御が可能な藻類培養試験器を使用し、単藻培養株の成熟性を評価した。本装置は500 ml三角フラスコ50個を同時に培養に供することができる(槽内寸法:幅1250×奥行720×高さ900mm)。大型海藻ツルシラモの単藻培養株から長さ4mmのアピカルフラグメントを調製し、培養海水400mlの入った三角フラスコ1本当たりフラグメント6本を添加した。照射条件は14時間明期、10時間暗期の条件で行い、培養液交換は1週間ごとに行った。同一培養条件での実験点数は5点とした。

[0045] 次いで、単藻培養株の成熟性評価を、(i) 光強度 $60 \mu \text{mol}/\text{m}^2 \text{sec}$ の一定条件で温度6水準(10℃から30℃まで4℃きざみ)、(ii) 温度 $22 \pm 0.5^\circ\text{C}$ の条件で光強度5水準($20 \mu \text{mol}/\text{m}^2 \text{sec}$ から $100 \mu \text{mol}/\text{m}^2 \text{sec}$ まで $20 \mu \text{mol}/\text{m}^2 \text{sec}$ きざみ)の

合計11の条件でエアレーションしながら行った。

[0046] また、培養液交換と海藻湿質量測定を、クリーンブース内で行った。このようにして、フラスコ1本当たりの海藻湿質量を記録するとともに、海藻表層での嚢果や四分孢子嚢あるいは精子嚢果などの生殖器官の形成の有無を顕微鏡で観察することにより、成熟の有無を判断した。

[0047] この結果、12週間培養した後においても、成熟した海藻の実験区は認められなかった。1個の500ml三角フラスコ内の海藻湿質量が0.2gに達した時点で、0.02gまで間引きして培養を継続したが、培養開始[(5)工程開始]より3年を経過しても成熟しなかった。

[0048] 生長率

相対的成長率(Relative growth rate:RGR)をRとして表す。培養開始時の海藻湿質量を W_0 、培養t日後の海藻湿質量を W_t とすると、 $R = (\ln W_t - \ln W_0) / t$ により相対生長率が求められる。生長率(%/日)はRに100を乗じて算出した。

培養2週間から3週間にかけてのツルシラモ(勝浦川河口産)単藻培養株の生長率は、実験区の中で、温度22℃、光強度 $60 \mu \text{mol} / \text{m}^2 \text{sec}$ の条件で最大の生長率であり、その値は14.4%/日であった。

[0049] 20リットル培養液での生長と成熟評価

ツルシラモ(勝浦川河口産)単藻培養株を1リットルの平底フラスコ10本で培養し、湿質量4g以上まで増殖させた。400ml規模培養で最大生長率が得られた条件「温度22℃、光強度 $60 \mu \text{mol} / \text{m}^2 \text{sec}$ 、光周期は14時間明期－10時間暗期、終日エアレーション、培地交換1週間で1回の割合」をこのときの培養条件に設定した。この培養条件を以下、増殖培養条件という。

[0050] 培養液(海水培地)は、香川県高松市屋島湾水深1.5mで採取した海水を0.20 μm のセルロースアセテートメンブランフィルター(アドバンテック東洋社製)でろ過後、1/10容量の蒸留水を添加し混合した後で、100℃30分間滅菌し、予め滅菌処理したProvasoli(プロバゾリ)の海水補強栄養剤を添加して調製した。以下この培養液(海水培地)を増殖培養用海水という。

[0051] 増殖培養して得られたツルシラモ(勝浦川河口産)単藻培養株4gを増殖培養用海

水20リットルが入っている30リットルの培養容器に移植し、増殖培養条件で4週間培養した。4週間後に海藻湿質量は約12倍の約47gに増加した。

[0052] 12週間培養した後でも、成熟した海藻の実験区は見られなかった。その後、増殖培養海水20リットルが入っている30リットル培養容器内の海藻湿質量が300gに達した時点で、10gまで間引きして培養を継続した。培養開始より3年を経過しても、単藻培養株は成熟しなかった。400ml培養液量及び20リットル培養液量での単藻培養株の生長率、海藻収量及び成熟の有無を表4に示す。

[表4]

	培養液400ミリリットルでの培養		培養液20リットルでの培養	
	培養2週目から3週目までの生長率(%/日)	成熟の有無	海藻湿質量変化(培養4週間)	成熟の有無
単藻培養株 (実施例2)	14.4	3年以上成熟せず	4gが培養4週間で約47gに増加	3年以上成熟せず
単藻培養株 (比較例1)	8.2	培養12週目で成熟	4gが培養4週間で約12gに増加	培養12週目で成熟
単藻培養株 (比較例2)	7.7	培養11週目で成熟	4gが培養4週間で約11gに増加	培養11週目で成熟

[0053] (6) 単藻培養株の生理活性物質活性量の評価

(a) 水溶性画分の抽出

培養4週目で得られたツルシラモ(勝浦川河口産)湿質量25gを0.15M塩化ナトリウム水溶液で洗浄後、-30℃で凍結した。30mM塩化カリウムと3μM硫酸亜鉛、5mM 2-メルカプトエタノールを含んだ0.5Mトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン-塩酸緩衝液(pH8.2)を抽出用緩衝液として使用し、細かく粉碎した凍結海藻(ツルシラモ湿質量500g相当)に対し、抽出用緩衝液40mlを加えてホモゲナイズしたのち、このホモゲナイズした液を4℃で6時間静置後、遠心分離して上澄である粗抽出液を得た。

- [0054] 次いで、この粗抽出液に、最終濃度35%飽和溶液になるように硫酸アンモニウムを加えて1段目の塩析を行った。硫酸アンモニウムを添加してから4℃で1時間静置し、生成した沈殿を遠心分離して除去した。この操作で色素などの夾雑物が沈殿画分として除去された。次に、遠心分離で得た上澄に、最終濃度70%飽和溶液になるように硫酸アンモニウムを添加し、4℃で一晩静置したのち、生成した沈殿を遠心分離して分離した。分離した沈殿画分を、0.15M塩化ナトリウム含有100mMリン酸緩衝液(pH6.9)で再溶解し、次いで0.15M塩化ナトリウム含有100mMリン酸緩衝液(pH6.9)に対して透析し、粗活性画分を得た。得られた粗活性画分のウサギ赤血球に対する赤血球凝集活性は512単位であり、比活性は6948単位/mgプロテインであった。ここで、凝集活性の単位は、凝集活性が検出できる試料の最大希釈率の逆数と定義した。
- [0055] 培養3年目で得られたツルシラモ(勝浦川河口産)湿質量25gを0.15M塩化ナトリウム水溶液で洗浄後、-30℃で凍結した。30mM塩化カリウムと3 μ M硫酸亜鉛、5mM 2-メルカプトエタノールを含んだ0.5Mトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩酸緩衝液(pH8.2)を抽出用緩衝液として使用し、細かく粉碎した凍結海藻(ツルシラモ湿質量500g相当)に対し、抽出用緩衝液40mlを加えてホモゲナイズしたのち、このホモゲナイズした液を4℃で6時間静置後、遠心分離して上澄である粗抽出液を得た。
- [0056] 次いで、この粗抽出液に、最終濃度35%飽和溶液になるように硫酸アンモニウムを加えて1段目の塩析を行った。硫酸アンモニウムを添加した後、4℃で1時間静置し、生成した沈殿を遠心分離して除去した。この操作で色素などの夾雑物が沈殿画分として除去された。次に、遠心分離で得た上澄に、最終濃度70%飽和溶液になるように硫酸アンモニウムを添加した後、4℃で一晩静置し、生成した沈殿を遠心分離して分離した。分離した沈殿画分を、0.15M塩化ナトリウム含有100mMリン酸緩衝液(pH6.9)で再溶解し、次いで0.15M塩化ナトリウム含有100mMリン酸緩衝液(pH6.9)に対して透析し、粗活性画分を得た。得られた粗活性画分のウサギ赤血球に対する赤血球凝集活性は512単位であり、比活性は6810単位/mgプロテインであった。結果を表5に示す。

[表5]

		粗活性画分	
		凝集活性 ^{*)}	比活性
		(単位)	(単位／mg プロテイン)
単藻培養株 (実施例2)	培養4週間目	5 1 2	6 9 4 8
	培養3年目	5 1 2	6 8 1 0
単藻培養株 (比較例1)	培養4週間目	2 5 6	3 2 0 4
単藻培養株 (比較例2)	培養4週間目	2 5 6	3 0 6 3

^{*)}凝集活性は粗活性画分を連続希釈し、凝集活性を示す最大希釈率から算出した。

[0057] 上記で得られた粗活性画分についてマイトジェン活性を測定し、そして、ヒトリンパ球幼若化試験を行った。

[0058] 次に、³H-チミジンの取り込みによる、ヒトリンパ球幼若化試験を行って、粗活性画分の精製標品に対するマイトジェン活性を測定した。この場合、すべての細胞培養に要する材料、例えば、マイクロプレート、セルハーベスター、グラスファイバーフィルター、カウンティングバイアル、³H-チミジン、トルエンシンチレーター(POPO 0.1g + PPO 5g/リットルトルエン)、液体シンチレーションカウンターの準備およびこれらを用いて行う操作はいずれも無菌的に行った。

[0059] 次に、培養液として純水100mlに対して培地(バイオウィットカー社製、製品名「RPMI 1640」)1.05g、炭酸水素ナトリウム 0.2g、ペニシリン10000ユニット、ストレプトマイシン10mg、ウシ胎児血清10mlの割合で溶解した水溶液を準備し、フィルターでろ過滅菌後、使用量にあわせて小びんにつめ、密栓して-20℃で保存した。この状態で2か月は保存使用可能であった。使用時は開栓して使い切るようにし、凍結融解は繰り返さないようにした。

[0060] リンパ球は、ヘパリン添加血液からフィコール・コンレイ法により分離し、CMF-PBS(pH7.0)で3回洗浄したのち、培養液1mlに懸濁し、リンパ球数を算定した。次いで培養液でリンパ球数が 5×10^5 個/mlになるよう調製した。

[0061] リンパ球の培養は、マイクロプレートの各ウェルに、リンパ球浮遊液を200 μ lずつ分注することによって行われた。次いでリンパ球の入ったマイクロプレートを30分間クリーンブース内に静置後、マイトジェン溶液として、粗活性画分及びリン酸緩衝液(PE S)を各ウェルに20 μ lずつ分注した。粗活性画分から、緩衝液で希釈した希釈液(10倍希釈から320倍希釈)を調製し、実験に供した。粗活性画分での ^3H -チミジンの取り込み量(cpm)は、希釈液での測定値に希釈倍率を乗じて原液に換算した値を算出することにより求めた。

次いで5%CO₂含有空気中37℃の湿潤状態で、リンパ球を3日間培養した。培養終了8時間前に ^3H -チミジンを培養液当りの最終濃度が1 μ Ci/mlになるように各ウェルに分注した。

[0062] 活性の測定は次のように行った。Labo-MASH等を用いて食塩水でウェル内をハーベストしつつ、細胞をグラスファイバーフィルター上に集め、これを連続吸引してフィルター上の細胞を洗浄した(約20秒間、生理食塩水約1.5ml)。次いでグラスファイバー上の細胞固着部を剥離し、カウンティングバイアルに入れ、十分乾燥させた。液体シンチレーター5mlをディスペンサーを用いて各バイアルに分注し、シンチレーションカウンターにより計測した。培養4週間目の単藻類培養株から得られた粗活性画分の評価には3人分の検体(以下、検体I、検体II及び検体IIIという)からのリンパ球を用いて実験した。所定実験条件での実験数を3回とし、3回の測定の平均値を求め、その結果を表6に示す。また、培養3年目の単藻類培養株から得られた粗活性画分の評価には3人分の検体(以下、検体IV、検体V及び検体VIという)からのリンパ球を用いて実験した。所定実験条件での実験数を3回とし、3回の測定の平均値を求め、その結果を表7に示す。

[表6]

	³ H-チミジンの取り込み量 (c p m)		
	検体 I	検体 II	検体 III
培養 4 週間目の単藻培養株から得た粗活性画分 (実施例 2)	9 1 4 6 0	1 1 1 4 6 0	9 0 8 0 0
培養 4 週間目の単藻培養株から得た粗活性画分 (比較例 1)	4 5 9 7 0	5 3 0 8 0	3 9 4 8 0
培養 4 週間目の単藻培養株から得た粗活性画分 (比較例 2)	3 0 2 0 0	3 9 0 8 0	2 6 4 0 0
陰性コントロール (PBS)	3 4 8	2 6 8	2 4 3

[表7]

	³ H-チミジンの取り込み量 (c p m)		
	検体 IV	検体 V	検体 VI
培養 3 年目の単藻培養株から得た粗活性画分 (実施例 2)	8 6 2 0 0	1 0 2 1 0 0	8 9 4 2 0
陰性コントロール (PBS)	2 6 4	3 2 0	2 9 8

[0063] 大型海藻は、硝酸態窒素、リン酸イオン、アンモニウムイオン(窒素)などの栄養塩を吸収する能力があるので、単藻培養株の栄養塩吸収能として、硝酸態窒素の1日当りの最大吸収量を評価した。

勝浦川産オゴノリ属海藻(勝浦川産ツルシラモ)の胞子から調製した単藻培養株の培養4週間目の単位湿質量当りの硝酸イオン最大負荷量は約0.4mg窒素/海藻湿質量g・日であった。結果を表8に示す。培養3年目の単位湿質量当りの硝酸イオン日最大負荷量も約0.4mg窒素/海藻湿質量g・日であった。

[表8]

		日最大窒素負荷許容量 (窒素mg／海藻湿質量g・日)
単藻培養株 (実施例2)	培養4週間目	0.4
	培養3年目	0.4
単藻培養株 (比較例1)	培養4週間目	0.2
単藻培養株 (比較例2)	培養4週間目	0.1

[0064] 比較例1

原料として、勝浦川産オゴノリ属海藻(勝浦川産ツルシラモ)の代わりに、ツルシラモ(吉野川河口域産)を用いた以外は実施例2と同様にして、単藻培養株を得た。

[0065] ツルシラモ(吉野川河口域産)から調製した単藻培養株について、成熟性の評価と生長速度を測定した結果、400ミリリットルの培養でも20リットルの培養でも12週間で成熟が認められた。また、生長率は、8.2%/日であり、4gの海藻の培養4週間後の質量も12gと「勝浦川産オゴノリ属海藻(勝浦川産ツルシラモ)」から調製した非成熟性単藻培養株より低かった(表4)。含まれている赤血球凝集活性は粗活性画分で256単位、比活性3204単位/mgプロテインと「勝浦川産オゴノリ属海藻(勝浦川産ツルシラモ)」から調製した非成熟性単藻培養株より低かった(表5)。マイトジェン活性は、3人の検体とも、「勝浦川産オゴノリ属海藻(勝浦川産ツルシラモ)」から調製した非成熟性単藻培養株より低かった(表6)。日最大窒素負荷許容量は、0.2mg窒素／海藻湿質量g・日と「勝浦川産オゴノリ属海藻(勝浦川産ツルシラモ)」から調製した非成熟性単藻培養株の2分の1の値であった(表7)。

[0066] 比較例2

原料として、勝浦川産オゴノリ属海藻(勝浦川産ツルシラモ)の代わりに、小松島沖産ツルシラモを用いた以外は実施例2と同様にして、単藻培養株を得た。

[0067] 小松島沖産ツルシラモから調製した単藻培養株について、成熟性の評価と生長速度を測定した結果、400ミリリットルの培養でも20リットルの培養でも11週間で成熟が認められた。また、生長率は、7.7%/日であり、4gの海藻の培養4週間後の質量も

11gと「勝浦川産オゴノリ属海藻(勝浦川産ツルシラモ)」から調製した非成熟性単藻培養株より低かった(表4)。含まれている赤血球凝集活性は粗活性画分で256単位、比活性3063単位/mgプロテインと「勝浦川産オゴノリ属海藻(勝浦川産ツルシラモ)」から調製した非成熟性単藻培養株より低かった(表5)。マイトジェン活性は、3人の検体のいずれも、「勝浦川産オゴノリ属海藻(勝浦川産ツルシラモ)」から調製した非成熟性単藻培養株より低かった(表6)。日最大窒素負荷許容量は、0.1mg窒素/海藻湿質量g・日と「勝浦川産オゴノリ属海藻(勝浦川産ツルシラモ)」から調製した非成熟性単藻培養株の4分の1の値であった(表7)。

[0068] それぞれの結果から、勝浦川産オゴノリ属海藻(勝浦川産ツルシラモ)の孢子から調製した単藻培養株は、通常の培養条件下で3年以上継続して培養しても成熟せず、しかも(1)生理活性物質の生産量が高い、(2)藻体の生長速度が早い、(3)栄養塩の吸収能力が高いという3点の特徴的性質のうち少なくとも一つの性質を有しているオゴノリ属紅藻類であることが分かる。

[0069] 勝浦川産オゴノリ属海藻(勝浦川産ツルシラモ)の孢子から調製した単藻培養株は、ツルシラモ(吉野川河口域産)の孢子から調製した単藻培養株あるいは、小松島沖産ツルシラモの孢子から調製した単藻培養株に比べ、(1)成熟しない、(2)生長量が高い、(3)生理活性物質含有量が高い、(4)栄養塩吸収能力が高い、という長所を有しており、工業的に実施するのに有利である。

[0070] 実施例3

実施例2と同様にして勝浦川河口産のツルシラモの孢子から非成熟性単藻培養株を調製し、これを5年間継続培養した。この培養株について、顕微鏡観察により、その表面に付着している他の藻類の数を計測したところ、培養株湿質量400mg当り10細胞未満であった。

[0071] 比較のために、小松島沖産ツルシラモを天然海域から採取し、実施例2記載の海水培地で3回洗浄後に、顕微鏡観察によりその表面に付着している他の藻類を計測したところ、既にツルシラモ湿質量400mg当り、約70000細胞の付着が認められた。また、この小松島沖産ツルシラモ天然採取藻体を、さらに実施例2記載の海水培地で10回洗浄後、藻体を3cmに切断し、さらに実施例2記載の海水培地で10回洗浄

して洗浄切片を得、この洗浄切片を実施例2記載の海水培地で培養を開始したところ、培養開始14日目で海藻切片を入れたフラスコ中で微細藻類の繁殖が目立ち、海藻湿質量増加が低減し、培養21日目の海藻湿質量は14日目の海藻湿質量を下回った。

このことから、本発明の非成熟性単藻培養株は、付着藻類を増殖させにくい性質を有することが分る。

産業上の利用可能性

[0072] 本発明の非成熟性単藻培養株は、付着藻類が付着しにくいので、増殖後、藻体から有用物質を回収する際に付着藻類由来の不純分や有毒成分が混入しないという利点がある。しかも(1)生理活性物質の生産量が高い、(2)藻体の生長速度が大きい、(3)栄養塩の吸収能力が高い、以上(1)から(3)の性質のうち少なくとも1つの性質を有している紅藻類大型海藻であり、長期間にわたって成熟させずに培養あるいは保存することができ、例えば、赤血球凝集剤のような生理活性物質の製造に好適に用いられる。

請求の範囲

- [1] 天然で成熟体として雌性配偶体が検出されず、四分孢子体のみの成熟体が検出される特徴をもち、淡水混入天然海水域で繁殖する紅藻類大型海藻由来の非成熟性単藻培養株。
- [2] 紅藻類大型海藻がオゴノリ属紅藻類 (*Gracilaria* sp.) である請求の範囲第1項記載の非成熟性単藻培養株。
- [3] オゴノリ属紅藻類がオゴノリ (*Gracilaria verrucosa*)、ツルシラモ (*Gracilaria chorda*) 又はそれらの亜種である請求の範囲第2項記載の非成熟性単藻培養株。
- [4] 3年間継続培養後において、湿質量400mg当りの付着藻類が10細胞未満である請求の範囲第1、2、又は3項記載の非成熟性単藻培養株。
- [5] 天然で成熟体として雌性配偶体が検出されず、四分孢子体のみの成熟体が検出される特徴をもち、淡水混入天然海水域で繁殖している紅藻類大型海藻の成熟孢子体を採取し、この孢子体を切断して静置することにより孢子を放出させ、放出された孢子を培養し、発芽した孢子から直立体が生育した後も増殖培養することを特徴とする非成熟性単藻培養株の製造方法。
- [6] 紅藻類大型海藻がオゴノリ属紅藻類 (*Gracilaria* sp.) である請求の範囲第5項記載の非成熟性単藻培養株の製造方法。
- [7] オゴノリ属紅藻類がオゴノリ (*Gracilaria verrucosa*)、ツルシラモ (*Gracilaria chorda*) 又はそれらの亜種である請求の範囲第5項記載の非成熟性単藻培養株の製造方法。
- [8] 淡水混入天然海水域が塩分1.0質量%以下の海水域である請求の範囲第5、6又は7項記載の非成熟性単藻培養株の製造方法。
- [9] 得られる非成熟性単藻培養株が、3年間継続培養後において、湿質量400mg当りの付着藻類が10細胞未満である請求の範囲第5ないし8項のいずれかに記載の非成熟性単藻培養株の製造方法。
- [10] 請求の範囲第1ないし4項のいずれかに記載の非成熟性単藻培養株が増殖した藻体。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006167

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ A01H13/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ A01H13/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus (JOIS), BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), Medline (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	Hiroataka KAKITA et al., "Ogata Kaiso Tsurushiramo no Seicho eno Muroto Kaiyo Shinsosui no Eikyo", Bulletin of the Society of Sea Water Science, Japan, 01 August, 2000 (01.08.00), Vol.54, No.4, pages 310 to 315	1-10/1-10
Y	Edited by Ryuta TERADA et al., "Ogonori no Riyo to Tenbo", first edition, Koseisha Koseikaku, 10 October, 2001 (10.10.01), pages 27, 30 to 31, 33, 48, 101 to 104	1-10
Y	Hiroataka KAKITA et al., "Muroto Kaiyo Shinsosui no Tokusei Haaku oyobi Kino Kaimei", Heisei 10 to 12 Nendo Kagaku Gijutsu Sogo Kenkyu Itakuhi, Chiiki Sento Kenkyu, Kenkyu Seika Hokokusho, Zaidan Hojin Kochi-ken Sangyo Shinko Center, 2001.3, pages 176 to 192	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
19 May, 2005 (19.05.05)Date of mailing of the international search report
07 June, 2005 (07.06.05)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006167

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Hiroataka KAKITA et al., "Akamo Tsurushiramo Tanso Baiyokabu no Aldolase Kassei", Nippon Nogei Kagaku Kaishi, (2001 Nendo Taikai Koen Yoshishu), 05 March, 2001 (05.03.01), Vol.75, special extra issue, page 180 (2R3a4)	1-10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ A01H13/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ A01H13/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus (JOIS)、BIOSIS (DIALOG)、WPI (DIALOG)、Medline (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	垣田浩孝 他、 大型海藻ツルシラモの生長への室戸海洋深層水の影響、 日本海水学会誌、2000.8.1、第54巻、第4号、310-315頁	1-10/1-10
Y	寺田竜太、他2名編、 オゴノリの利用と展望、初版、恒星社厚生閣、2001.10.10、 27頁、30-31頁、33頁、48頁、101-104頁	1-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19.05.2005

国際調査報告の発送日

07.6.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

4B

3537

田村 明照

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	垣田浩孝 他、 室戸海洋深層水の特性把握および機能解明、 平成10～12年度 科学技術総合研究委託費 地域先導研究 研究成 果報告書、 財団法人高知県産業振興センター、2001. 3、176-192 頁	1-10
A	垣田浩孝 他、 紅藻ツルシラモ単藻培養株のアルドラーゼ活性、 日本農芸化学会誌 (2001 年度大会講演要旨集)、2001. 3. 5、 75 巻、臨時増刊号、180 頁 (2R3a4)	1-10